

## Gentamicin 저항성 R 플라스미드에 존재하는 *aacC2* 유전자의 상류부위에서 Tn3의 출현

한호심<sup>1</sup> · 김남덕<sup>1</sup> · 이영종<sup>1,3</sup> · 이효연<sup>2</sup> · 정재성<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>순천대학교 생물학과, <sup>2</sup>자원식물학과, <sup>3</sup>광주보건전문대 임상병리학과

병원하수에서 분리한 gentamicin 저항성 세균으로부터 *aacC2* 유전자를 가지고 있는 R 플라스미드 pGM5와 pGM6를 선발하였다. 이들 플라스미드에서 gentamicin 저항성 유전자를 포함하는 부분을 pUC18의 *Bam*HI 자리에 클로닝하여 재조합 플라스미드 pSY5와 pSY6를 각각 얻었다. 재조합 플라스미드의 삽입된 부분에 대한 제한효소 지도를 통해 Tn3 염기서열이 *aacC2* 유전자의 상류부위에 위치하는 것을 알았다. 재조합 플라스미드의 gentamicin에 대한 민감성의 비교를 통해 Tn3의 *bla* 유전자 부분과 3'역행중복 부위의 염기서열이 gentamicin 저항성 유전자의 발현에 중요한 역할을 담당하고 있었다.

KEY WORDS □ Gentamicin resistance, R plasmid, *aacC2*, Tn3, hybrid promoter

Aminoglycoside계 항생물질에 대한 저항성은 항생물질을 흡수하지 못하여 생기거나 리보솜의 변형에 기인하는 경우가 있지만, 대부분은 항생물질을 변형시키는 효소를 생산함으로써 일어나고 있다. Aminoglycoside의 변형효소는 변형시키는 활성에 따라 크게 acetyltransferases(AACs), phosphotransferases(APHs), adenyllyltransferases(ANTs)의 셋으로 나뉘어진다(13). 이러한 저항성 유전자들은 대부분 R 플라스미드에 존재하고 있으며, 빠르고 계속적인 변화를 통한 유전자 수준에서의 진화가 일어나고 있다(1, 3, 16). 뿐만 아니라 항생물질 저항성 유전자들이 transposon과 같은 전이요소와 연관되어 있는 경우 플라스미드와 염색체 사이를 유전적 상동성과 관계없이 이동할 수 있으므로 그 결과 다중항생물질 저항성 세균의 출현이 가능하게 된다(11). 또한 형질도입, 형질전환, 접합에 의한 저항성 유전자의 종내 또는 종간의 이동은 항생물질 저항성 세균의 빠른 전파에 중요한 역할을 담당하고 있다(5). 저항성 유전자에 미치는 전이요소의 다른 기능은 전이를 통한 새로운 promoter의 형성이다. 전이요소가 저항성 유전자의 상류부위로 전이됨으로써 promoter를 제공하여 저항성 유전자의 발현을 증가시키기도 한다(1, 6).

저자 등은 전보(9)에서, gentamicin에 대하여 높은 저항성을 보이는 R 플라스미드로부터 gentamicin 저항성 유전자를 cloning하여 염기서열을 분석한 바 있다. 그 결과 이 유전자의 염기서열은 aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase II(*aacC2*) 유전자(16)와 97%의 상동성을 보였으며 Tn3의 3'말단 염기서열에 의해 promoter의 -35 부위가 제공되고 있었다.

일반적으로 항생물질에 대한 낮은 수준의 저항성 세균은 항생물질이 오염되지 않은 환경에서 분리되기도 하지만 높은 수준의 저항성을 보이는 세균은 항생물질이 오염된 환경

즉, 병원, 양어장, 축산폐수 및 하수에서 분리되고 있다(14). 이러한 사실은 항생물질이 포함된 환경이 세균의 저항성을 유발시키는 강한 도태압으로 작용하고 있음을 말해준다. 본 연구에서는 항생물질이 많이 포함되어 있을 것으로 생각되는 병원하수로부터 gentamicin에 대하여 높은 저항성을 보이는 균주들을 선발하였다. 이 균주들에서 발견되는 저항성 유전자는 자연선택에 의해 발현에 적절한 구조를 하고 있을 것으로 기대하였다. 이들 균주에서 *aacC2* 유전자를 갖는 R 플라스미드를 분리하고, 이 플라스미드로부터 저항성 유전자를 cloning하여, 유전자의 promoter를 포함한 상류부위의 염기서열이 발현에 미치는 영향을 살펴보았다.

### 재료 및 방법

#### 균주, 플라스미드 및 배지

Gentamicin에 저항성을 나타내는 세균을 분리하기 위하여 gentamicin이 100 µg/ml 되게 첨가된 Plate Counting Agar(1 L당 trypton 5 g, yeast extract 2.5 g, glucose 1 g, agar 15 g) 배지에 병원하수를 도말하여 30°C에서 72시간 배양하여 자란 colony를 선발하였다. 형질전환을 위한 숙주로는 *Escherichia coli* JM109를 사용하였다. 본 실험에서 사용한 플라스미드는 gentamicin 저항성 균주로부터 분리한 R 플라스미드와 함께 이미 보고한 바 있는 pSY101(9)을 사용하였고 클로닝 벡터로는 pUC18을 사용하였다.

#### 플라스미드 DNA의 추출 및 조작

플라스미드 DNA의 추출은 Birnboim과 Doly의 방법(2)을 사용하였다. 각종 제한효소와 T4 DNA ligase 등은 Boehringer Mannheim사와 Promega사로부터 구입하였으며, 반응조건은 제조회사의 방법을 사용하였다. 플라스미드 DNA는 TAE 완충용액을 사용한 agarose gel에서, 작은 절편의 DNA

\*To whom correspondence should be addressed

는 8% polyacrylamide gel에서 TBE 완충용액을 사용하여 전기영동하였다. 그 밖의 방법은 Sambrook 등(12)의 방법을 따랐다.

### Polymerase Chain Reaction

Gentamicin에 저항성을 나타내는 R 플라스미드에 *aacC2* 유전자가 존재하는지 여부를 확인하기 위하여 PCR을 행하였다. PCR에 사용된 primer는 *aacC2* 유전자의 open reading frame (ORF)내에서 설계된 *aacC2*-1(5'-ACT GTG ATG GGA TAC GCG TC-3')과 *aacC2*-2(5'-CTC CGT CAG CGT TTC AGC TA-3')를 사용하였다(15). 이 primers는 *aacC2* 유전자의 237 bp부분을 증폭시킨다. *aacC2* 유전자의 상류에 Tn3가 존재하는지 알아보기 위한 PCR primer로는 Tn3와 *aacC2* 유전자에서 각각 설계된 GenF(5'-TTT TCG TTC CAC TGA GCG-3')과 GenR(5'-CGC CAT TCA GAG TCT CCT-3')을 사용하였다. 이 primers는 278 bp의 절편을 증폭시킨다. PCR의 반응액은 1 µl의 DNA(20 ng), 5 µl의 10× PCR buffer(100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl[pH 8.3]), 각각 50 pmole의 primer, 1.25 unit의 *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim GmbH), 10 mM deoxyribonucleic acid 각 1 µl을 넣고 증류수로 50 µl되게 하였다. Perkin Elmer사의 GeneAmp PCR System 2400을 사용하여 94°C에서 4분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 과정을 30회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 반응을 시켰다. 증폭된 DNA 절편은 1.2%의 agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

### Gentamicin에 대한 감수성 측정

Gentamicin 저항성 R 플라스미드를 가지고 있는 세균들의 gentamicin에 대한 감수성 측정은 Lancini 등(10)의 방법을 변형하여 사용하였다. 포화상태까지 배양된 세균 배양액을 gentamicin이 농도별로 들어 있는 5 ml의 Luria-Bertani (LB)배지에 백금으로 접종하였다. 접종된 배양액을 37°C에서 16시간 진탕배양한 후 600 nm에서 흡광도로 세포 밀도를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

Aminoglycoside계 항생물질에 대한 저항성 유전자의 구조와 발현을 알아보기 위해, 본 실험에서는 먼저 병원학수로부터 gentamicin 저항성 세균을 분리하였다. 이 세균들은 100 µg/ml의 gentamicin이 포함된 배지에서 뚜렷한 colony를 형성하였다. 이들로부터 R 플라스미드를 분리하여 *aacC2* 유전자가 존재하는지 여부를 PCR을 통해 확인하였다. 일반적으로 aminoglycoside 저항성 세균들은 저항성 유전자를 플라스미드에 가지고 있으며(4), 여러 저항성 유전자들 중에서 aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase II 효소의 유전자인 *aacC2*가 저항성 세균에서 가장 많이 발견되는 유전자인 것으로 알려지고 있다(8). 분리된 세균 중 20 kb 이상의 크기인 하나의 플라스미드를 가지고 있으면서 *aacC2* 유전자의 존재가 확인된 두 균주를 선발하여 이들 플라스미

A 1 2 3 4 B 1 2 3 4

**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis of R plasmids (A) and PCR products (B). The R plasmids isolated from gentamicin resistance bacteria were separated on 0.7% agarose gel. A 237 bp of PCR products were obtained with plasmid DNA and *aacC2* specific primers and run on 1.2% agarose gel (B). Lanes: 1, lambda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII* (A) and 100 bp-ladder (B); 2, linearized pSY101; 3, pGM5; 4, pGM6.

드들을 pGM5와 pGM6로 각각 명명하였다(Fig. 1A). *aacC2* 유전자의 primers를 사용한 PCR 결과 두 플라스미드에서 예상했던 237 bp의 증폭된 DNA 절편을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

R 플라스미드 pGM5와 pGM6에 있는 *aacC2* 유전자를 cloning하기 위하여 플라스미드들을 *Sau3A* 제한효소로 부분절단한 후 promoter 부분을 포함한 저항성 유전자를 pUC18의 *BamHI* 자리에 각각 ligation시켜 재조합 플라스미드 pSY5와 pSY6를 얻었다. 이 재조합 플라스미드의 크기는 각각 4.2 kb와 3.9 kb였다.

*aacC2* 유전자의 발현을 조절하는 promoter 부위의 염기서열의 차이를 알아보기 위해 이미 염기서열이 밝혀진 pSY101의 저항성 유전자(Fig. 4B)의 상류부위와 비교하였다. pSY 101은 *aacC2* 유전자를 포함하는 1.6 kb가 pUC18에 cloning 된 재조합 플라스미드이다. 이 플라스미드는 저항성 유전자의 상류부분에 Tn3의 염기서열 70 bp를 포함하고 있었다. 그 결과 Tn3의 inverted repeat 부분의 염기서열이 promoter의 -35 부위를 제공함으로써 hybrid promoter를 형성하여 전사를 개시하고 있었다(9). 즉, promoter의 -10 부위는 저항성 유전자로부터, -35 부위는 Tn3의 염기서열에 의해 제공되고 있었다. 이러한 구조는 항생물질이 존재하는 환경이 도태압으로 작용하여 생긴 결과로 생각된다. 그러므로 이와는 다른 구조의 promoter가 존재할 수 있고, 이들 구조의 비교를 통해 유전자 진화를 이해하는 자료를 제공할 수 있을 것으로 기대하였다.

본 실험에서 제조한 두 플라스미드 pSY5와 pSY6에서도 이와같은 Tn3 구조가 저항성 유전자의 상류부위에 위치하고 있는지 알기 위해 GenF와 GenR primer를 사용하여 PCR

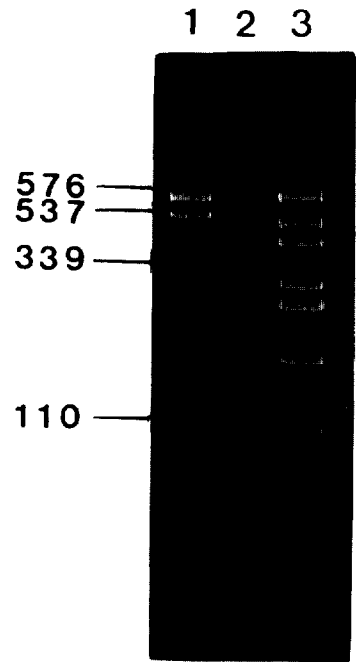


**Fig. 2.** Agarose gel (1.2%) electrophoresis of amplification products. A 276 bp fragments were amplified with PCR primers, GenF and GenR, and plasmid DNA. Lanes: 1, 100 bp-ladder marker; 2, pSY101; 3, pSY5; 4, pSY6; 5, negative control.

을 행하였다. 그 결과 예상했던 278 bp의 DNA가 증폭된 사실로 보아(Fig. 2), pSY5와 pSY6에서도 pSY101에서처럼 저항성 유전자의 상류에 Tn3가 존재함을 알 수 있었다.

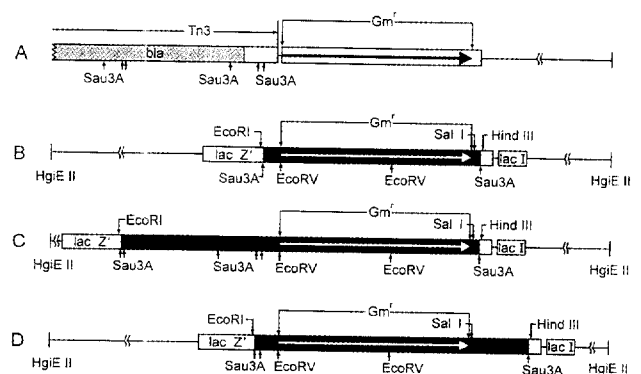
pSY5와 pSY6의 제한효소 지도를 작성하기 위해 두 플라스미드를 제한효소 *Hind*III와 *Eco*RI으로 절단하여 삽입절편을 얻은 결과 agarose gel에서 삽입절편 크기는 각각 1.5 kb와 1.2 kb였다. 이 삽입절편을 *Sal*I으로 처리하여 저항성 유전자의 3'부위를 제거하였다. *Sal*I 자리는 저항성 유전자의 종결코돈에서 하류로 6 뉴클레오티드 떨어진 곳에 위치하고 있다(Fig. 4B)(9). *Sal*I을 처리하여 3'부위를 제거한 절편의 크기는 각각 약 1.5와 1.0 kb였다(data 제시안함). 이 DNA 절편을 다시 *Eco*RV로 처리하여 얻어진 단편들의 크기를 polyacrylamide gel 전기영동으로 측정할 결과 pSY5는 576, 537과 339 bp의 3개 단편으로, pSY6는 537, 339과 110 bp 크기의 단편으로 잘려졌음을 알 수 있었다(Fig. 3). 공통적으로 나타나는 537 bp단편은 두 *Eco*RV 사이의 단편이고, 339 bp는 *Eco*RV와 *Sal*I사이의 DNA 절편이다. 결과적으로 ORF에 있는 5'쪽 *Eco*RV 자리로부터 pSY5는 576 bp, pSY6은 110 bp떨어진 곳의 *Sau*3A 자리가 잘려 cloning되었음을 말해 준다. 이러한 결과들로부터 pSY5와 pSY6의 구조를 Fig. 4에서와 같이 추론할 수 있었다. 즉, 이들 세 경우 저항성 유전자는 R 플라스미드상에서 같은 구조를 하고 있으나, cloning되는 과정에서 저항성 유전자를 둘러싼 부분이 다르게 포함되었음을 알 수 있었다.

이미 알려진 Tn3의 염기서열(7)과 비교하여 저항성 유전자의 5'쪽을 살펴보면, pSY101에서는 유전자의 ORF에서 34 bp 떨어져 Tn3 구조가 나타났고, 이 transposon의 3'말단



**Fig. 3.** Electrophoresis of restriction fragments of pSY5 and pSY6 in polyacrylamide gel (8%). Recombinant plasmids were digested with *Eco*RI and *Hind*III to obtain the insert fragments. After removing 3' region by *Sal*I digestion, the remaining fragments were harvested from gel and subsequently digested with *Eco*RV. Lanes: 1, pSY5; 2, pSY6; 3, *Hae*III digested pUC18 DNA.

으로부터 70 bp떨어진 곳(Tn3의 4,888번째 염기)에 위치한 *Sau*3A 자리(Tn3의 3'말단으로부터 첫번째)가 잘려서 cloning된 플라스미드였다(Fig. 4B)(9). 한편, pSY5는 3'말단으로부터 576 bp 떨어진 Tn3의 4,412번째 염기(Tn3의 3'말단으로부터 다섯 번째 *Sau*3A)에서, pSY6는 110 bp떨어진 4,876번째 염기에 있는 *Sau*3A 자리부터(Tn3의 3'말단으로부터 두 번째) cloning된 플라스미드였다(Fig. 4C, D). pSY6의 삽입절편을 *Sal*I으로 처리했을 때 크기가 약 0.2 kb 감소하는 사실로 pSY101이나 pSY5에 비해 pSY6은 3' 방향으로



**Fig. 4.** Restriction enzyme map of plasmids. The dark regions are sequences of insert fragments. The arrows in boxes indicate the extent of gentamicin resistance gene (*aacC2*). (A), proposed map of R plasmids; (B), pSY101; (C), pSY5; (D), pSY6.

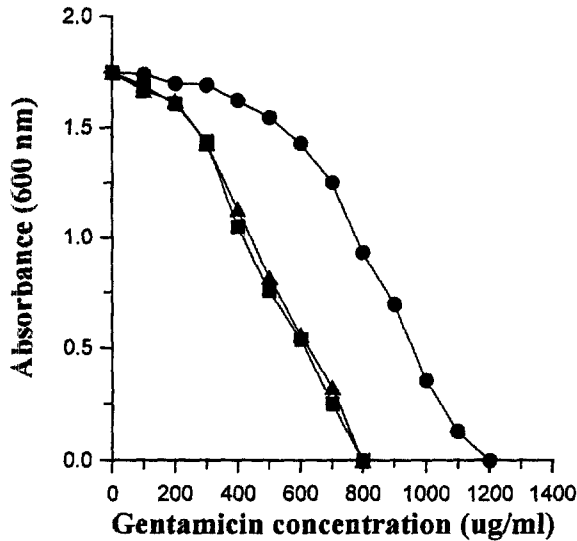


Fig. 5. Comparison of gentamicin susceptibility of recombinant plasmids. *E. coli* JM109 harboring recombinant plasmid was inoculated in LB media containing gentamicin. After 16 h of culture at 37°C, the absorbance was measured at 600 nm. Symbols: ●, pSY5; ▲, pSY6; ■, pSY101.

200 bp가량이 더 포함되어 cloning되었음을 알 수 있었다.

이와같이 전이요소가 저항성 유전자의 상류로 삽입되어 hybrid promoter를 형성한 경우가 IS140에서 보고된 바 있다 (1, 3). 그밖에도 여러 종류 IS들의 끝부분에 promoter의 -35 부위를 제공할 수 있는 염기서열이 존재하는 사실로, 이들이 적절한 위치로 전이되었을 때 hybrid promoter가 형성될 것으로 생각되고 있다(6).

상류부위에 동일한 Tn3 염기서열을 가지고 있는 세 재조합 플라스미드의 gentamicin에 대한 저항성을 비교하였다. pSY101에서는 상류로 삽입된 Tn3의 4,937에서 4,941번째 염기에 의해 -35 부위가 제공되어 hybrid promoter가 형성되고, 전사가 개시되고 있었다(9). pSY5와 pSY6에서도 pSY101와 같은 구조의 promoter를 가지고 있으므로 gentamicin에 대한 저항성이 같을 것으로 예상하였으나 pSY5의 경우가 다른 두 플라스미드에서 보다 더 높았다(Fig. 5). pSY5는 pSY101이나 pSY6보다 5'부위를 더 많이 포함하고 있으므로 이 부분이 유전자 발현을 증가시키는 요인으로 생각된다. 즉, pSY101에서 발견된 hybrid promoter 외에 또 다른 promoter가 상류부위에 존재하여 저항성 유전자의 전사를 증가시키는 것으로 생각된다. 현재 hybrid promoter 외에 Tn3에 존재하는 새로운 promoter에 대한 연구를 진행하고 있다. pSY6는 pSY101과 유사한 저항성을 보이는 점으로 보아 pSY6에서 3' 부위가 더 포함된 사실이 전사를 증가시키는 요인으로 작용하지 않음을 알 수 있었다.

결론적으로, 자연환경으로부터 분리한 gentamicin 저항성 세균에서 gentamicin 저항성 유전자의 상류에 Tn3가 전이되어 유전자의 재배열이 일어났음을 알 수 있었다. 이와같은 Tn3의 전이는 자연도태의 결과로 생각되며, 두가지 면에서 세균에 유리한 점을 제공하고 있다. 우선 gentamicin 저항성 유전자의 promoter들을 제공하여 전사를 증진시킬 뿐 아니

라, Tn3에 존재하는 ampicillin 저항성 유전자도 함께 제공함으로써 이 유전자구조를 갖는 세균이 자연환경에서 선택될 가능성을 높이게 된다. 실제로 aminoglycoside계 항생물질을 사용할 때 상승효과를 위해 beta-lactam계 항생물질을 함께 사용하는 경우가 많은 사실로 미루어, 이러한 구조는 자연에 의한 유전자 재조합의 결과로 생각된다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 핵심전문연구(961-0510-079-1) 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Allmansberger, R., B. Bräu, and W. Piepersberg. 1985. Genes for gentamicin-(3)-N-acetyl-transferases III and IV: II. Nucleotide sequence of three AAC(3)-III genes and evolutionary aspects. *Mol. Gen. Genet.* **198**, 514-520.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bräu, B., U. Pitz, and W. Piepersberg. 1984. Genes for gentamicin-(3)-N-Acetyltransferase III and IV: I. Nucleotide sequence of the AAC(3)-IV gene and possible involvement of an IS140 element in its expression. *Mol. Gen. Genet.* **193**, 179-187.
- Courvalin, P. and C. Carlier. 1981. Resistance towards aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics in bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **8**, 57-69.
- Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**, 375-382.
- Galas, D.J. and M. Chandler. 1989. Bacterial insertion sequences, p. 109-162. In D. E. Berg and M. M. Howe (ed.), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Heffron, F., B.J. McCarthy, H. Ohtsubo, and E. Ohtsubo. 1979. DNA sequence analysis of the transposon Tn3: three genes and three sites involved in transposition of Tn3. *Cell* **18**, 1153-1163.
- Ho, B.S.W., R.S. Hare, K.J. Shaw, G.H. Miller, and M. H. Ng. 1993. Determination of aminoglycoside resistance mechanisms of Enterobacteriaceae isolated from a hospital in Hong Kong with antibiogram and genotyping. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**, 174-176.
- Jung, J.S., T.C. Cheong, M.S. Cho, Y.C. Hah, and J.H. Chung. 1994. Nucleotide sequence and expression of a gentamicin resistance gene isolated from the R plasmid in *Serratia marcescens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 1084-1089.
- Lancini, G., F. Parenti, and G.G. Gallo. 1995. *Antibiotics: A multidisciplinary approach*, p. 16. Plenum Press, New York.
- Lyon, B.R. and R. Skurray. 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. *Microbiol. Rev.* **51**, 88-134.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1990. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Shaw, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare, and G.H. Miller.

1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**, 138-163.
14. Young, H.-K. 1993. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**, 627-635.
15. van de Klundert, J.A.M. and J.S. Vliegenthart. 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes, p. 547-552. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and application*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
16. Vliegenthart, J.S., P.A.G. Ketelaar-van Gaalen, and J.A. M. van de Klundert. 1989. Nucleotide sequence of the *aacC2* gene, a gentamicin resistance determinant involved in a hospital epidemic of multiply resistant members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1153-1159.

(Received July 23, 1997/Accepted September 6, 1997)

---

**ABSTRACT: Occurrence of Tn3 Sequence Upstream of *aacC2* Gene in Gentamicin Resistance R Plasmids**

Hyo Sim Han<sup>1</sup>, Nam Deok Kim<sup>1</sup>, Young Jong Lee<sup>1,3</sup>, Hyo Yeon Lee<sup>2</sup> and Jae Sung Jung<sup>1\*</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. of Biology and <sup>2</sup>Dept. of Resources Plant, Suncheon National University, Suncheon 540-742,  
<sup>3</sup>Dept. of Clinical Pathology, Kwangju Health College, Kwangju 506-701, Korea)

Two gentamicin resistance R plasmids, pGM5 and pGM6, containing *aacC2* gene were selected from environmental isolates. The gentamicin resistance determinants of R plasmids were cloned into the *Bam*HI site of pUC18. Restriction enzyme map of inserted region of recombinant plasmids, pSY5 and pSY6, and PCR results indicated that Tn3 sequence was located upstream of gentamicin resistance gene. Based on the restriction maps and susceptibility tests, it was concluded that the sequence of *bla* and 3' inverted repeat of Tn3 play a important roles in the expression of gentamicin resistance gene.